

AGLUTINACIÓN DE MICROVESÍCULAS ERITROCITARIAS POR ANTICUERPOS IgG COMO UN FENÓMENO INDEPENDIENTE DEL CITOESQUELETO

JOSÉ CARLOS JAIME PÉREZ

La aglutinación eritrocitaria es un fenómeno físico-químico que involucra varios factores complejos.^{1,2} Este fenómeno es particularmente importante en el banco de sangre ya que constituye el punto final de la mayoría de las pruebas empleadas rutinariamente en esta disciplina. La hemaglutinación mediada inmunológicamente tiene dos estadios básicos: la fase de sensibilización, invisible, que consiste en la unión del anticuerpo a los determinantes antigénicos sobre la superficie del glóbulo rojo (GR), y la fase visible de la aglutinación, que resulta de colisiones al azar entre los eritrocitos sensibilizados cubiertos de anticuerpo, que conduce al entrecruzamiento de los eritrocitos.^{3,4} Los anticuerpos de la clase IgG requieren de la adición del reactivo de antiglobulina humana (AGH) para generar este fenómeno.⁴

Una doble capa de fosfolípidos constituye la membrana del GR, con proteínas embebidas que siguen un modelo de mosaico fluido, y una malla subyacente de proteínas que constituyen el citoesqueleto. Las funciones del citoesqueleto incluyen el mantenimiento de la integridad de la membrana, el preservar la forma y deformabilidad del GR y la restricción de la movilidad lateral de la Banda 3.^{5,6}

Debido a la complejidad de la asociación entre la membrana y el citoesqueleto la separación de eventos entre estas dos estructuras es difícil, particularmente con respecto a la participación e importancia de las proteínas del citoesqueleto en el fenómeno de la aglutinación. Para simplificar la composición de la membrana del GR se han desa-

rollado métodos para la producción de microvesículas eritrocitarias, libres de las proteínas mayores del citoesqueleto,^{7,8} lo cual permite la distinción experimental entre los eventos de la membrana plasmática y los del citoesqueleto. Las microvesículas preservan la orientación normal de la membrana del GR y su inmunoreactividad.¹⁰

La concanavalina A es una lectina con una fuerte afinidad por la Banda 3, la mayor proteína integral de la membrana del GR y la cual conduce a la aglutinación no inmune de los GRs después de su tratamiento proteolítico.¹¹ El fenómeno de la aglutinación se encuentra abolido en microvesículas generadas a partir de GRs aglutinables por Concanavalina A.¹² Se concluyó que la razón para dicha pérdida de la aglutinabilidad era la ausencia de las proteínas del citoesqueleto, lo cual sugiere un importante rol del citoesqueleto en la aglutinación eritrocitaria.¹²

Los autoanticuerpos de la clase IgG, predominantemente los de la subclase IgG1, son responsables de la destrucción de los GRs por un mecanismo inmunológico en pacientes con anemia hemolítica autoinmune (AHAI),¹³ causada por auto-anticuerpos calientes. Los auto-anticuerpos de la subclase IgG3, sin embargo, son los más efectivos

*Servicio de Hematología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José E. González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Dirección: Dr. Med José Carlos Jaime-Pérez. Calle La Silla #401, Colonia Protexa, C.P. 66170. La Fama, Nuevo León, México. Teléfono y número de Fax: 8348-6136 y 8348-8510. Correo electrónico: carjaime@hotmail.com

en conducir a la destrucción de los GRs.¹⁴ Los autoanticuerpos de la clase IgG usualmente son detectados por medio de la reacción de la AGH.⁴ La especificidad del autoanticuerpo ha sido reportada para una gran variedad de antígenos eritrocitarios, aunque aquellos pertenecientes al sistema Rh parecen predominar.¹⁴

Se ha demostrado que los autoanticuerpos IgG con especificidad hacia la Banda 3 desempeñan un papel conspicuo en los casos de AHAI en los que no existe una especificidad claramente reconocible hacia alguno de los antígenos del sistema Rh u otros antígenos de grupos sanguíneos, fijándose a una densidad de sitios antigénicos de 1×10^6 por eritrocito.¹⁵ Tal densidad antigénica corresponde a la de la Banda 3 sobre la superficie de los eritrocitos normales.¹⁶ La Banda 3 inmunoprecipitada ha sido previamente aislada e identificada como el antígeno involucrado.¹⁵

Materiales y métodos

Generación de vesículas

Se generaron cinco diferentes preparaciones de vesículas a partir de eritrocitos grupo O por el método de Leonards y Ohki,⁹ modificado por Victoria *et al.*¹⁰ Las vesículas producidas por este método mantienen su integridad citoplásmica, su orientación normal de membrana y su inmunoreactividad.¹⁰

La composición proteica de las vesículas generadas fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).¹⁷ Los geles fueron teñidos (azul brillante de Coomassie, Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Las bandas proteicas fueron identificadas siguiendo la nomenclatura de Steck,¹⁸ utilizando proteínas marcadoras de peso molecular estándar (Boehringer Mannheim GMBH-Biochemica, Mannheim, Alemania).

Para determinar el volumen de suspensión necesario para contener 300 µg de proteína vesicular, se determinó dicho contenido por el método de Lowry *et al.*,¹⁹ usando como estándar albúmina sérica bovina.

Preparación de eluidos

Después de obtenerse el consentimiento informado de los pacientes y la aprobación del comité de investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José E. González, se obtuvieron 35 mL de sangre con un hematocrito promedio de

27% de 10 pacientes dependientes de transfusión con AHAI por anticuerpos calientes, sin especificidad para ninguno de los antígenos del sistema Rh u otras especificidades definidas serológicamente y con pruebas de AGH con reacciones 4+.

Se prepararon eluidos de los 10 pacientes con AHAI, 20 donadores de sangre normales con una prueba de AGH positiva exhibiendo una reactividad anti-IgG de 2+ a 4+, y anti-D, (título, 1024), por el método de Rekvig y Hannestad.²⁰ Los eluidos de los GRs de pacientes con AHAI fueron estudiados con varios paneles de GRs representando fenotipos comunes y raros, por técnicas previamente descritas.⁴ Se incluyeron también eritrocitos modificados por enzimas. Se obtuvieron reacciones de hemaglutinación con grados 4+, pero no se encontró un patrón discernible de reactividad que condujera a identificar una especificidad reconocible del autoanticuerpo dentro del sistema Rh u otra especificidad definida serológicamente.

Aloantisueros

Se determinaron los títulos de otros ocho eluidos IgG de antisueros comunes (anti-C,-E,-c-e-M-S-Fy^a, -K), los títulos fueron determinados por dobles diluciones con células rojas de paneles eritrocitarios, positivas para el antígeno correspondiente. Los títulos variaron de 32 a 256.

Aglutinabilidad con anti-IgG de microvesículas sensibilizadas con anticuerpos IgG

Los experimentos se hicieron por duplicado. Suspensiones de vesículas conteniendo 300 µg de proteína vesicular en un volumen promedio de 150 µL (125-164 µL) fueron agregadas a tubos de polipropileno e incubadas con 200 µL de eluido de pacientes con AHAI, donadores con una prueba AGH positiva, anti-D, otros aloantisueros, solución salina amortiguada normal (BNS) o suero humano normal diluido. Los tubos fueron incubados por 60 minutos a 37°C en un baño de agua con agitación continua. Lo anterior fue seguido por una serie de tres lavados con BNS helada a 35,000xg por 30 minutos (centrífuga RC-2B, Sorvall, Newton, CT) para eliminar el exceso de eluido. Después de cada lavado las vesículas fueron resuspendidas en un agitador vórtex. Después del tercer lavado se agregaron 200 µL de anti-IgG humana monoclonal de ratón (Janssen Biochimica, Piscataway, NJ), lo cual

fue seguido por un último paso de centrifugación a 35,000xg por 30 minutos. La interpretación y calificación de las reacciones con la AGH se efectuó por técnicas serológicas convencionales.⁴ Todos los tubos con reacciones macroscópicas negativas fueron examinados bajo el microscopio.

Determinación de fijación inmuno-específica

Los experimentos para determinar la unión inmuno-específica de los autoanticuerpos IgG a las vesículas eritrocitarias fueron realizados con eluidos de seis pacientes con AHAI y ¹²⁵I proteína A sin alcanzar condiciones de saturación de anticuerpo. Los autoanticuerpos IgG en la AHAI son predominantemente de la subclase IgG1.¹³ La proteína A se une a la IgG1 en una relación 1:1 pero no reacciona con la Ig3.²¹ La fijación de anti-D también se investigó. Se usaron como controles de captación inespecífica de ¹²⁵I proteína A suero humano normal y BNS. Estos experimentos fueron hechos como los anteriores pero después de la tercera centrifugación el botón de vesículas fue resuspendido. Veinte µL de ¹²⁵I Proteína A (Amersham, Arlington Heights, IL) conteniendo en total 1.99x10⁶ cuentas por minuto fueron agregadas y la suspensión resultante de microvesículas sensibilizadas-¹²⁵I proteína A fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Las preparaciones fueron lavadas tres veces con BNS helada a 35,000 x g por 30 minutos para eliminar el exceso de ¹²⁵I proteína A, el botón de vesículas fue resuspendido por agitación vigorosa con 1 mL de BNS y transferido a un tubo de conteo; las cuentas por minuto (cpm) fueron determinadas en un contador gamma (Beckman, Fullerton, CA).

Resultados

Los patrones de tinción con azul brillante de Coomassie de los geles SDS-PAGE confirmaron la ausencia de las proteínas mayores del citoesqueleto en las preparaciones vesiculares (figura 1). Después de la hemoglobina (Hb) la Banda 3 fue el mayor

Tabla I. Aglutinación de microvesículas eritrocitarias con 10 eluidos de autoanticuerpos de pacientes con AHAI, Anti-D, BNS y suero

Eluido	Diagnostico	Título AGH	Reacción AGH
1	AHAI*	2,048	4+
2	AHAI	1,024	4+
3	AHAI	1,024	4+
4	AHAI	512	4+
5	AHAI	512	4+
6	AHAI	256	4+
7	CLL†	512	4+
8	LLC	256	4+
9	LNH‡	256	4+
10	LNH	256	4+
11	Anti-D	1,024	3+
12	BNS¶	0	neg
13	Suero	0	neg

*= Anemia hemolítica autoimmune.

†= Anemia hemolítica autoimmune secundaria a leucemia linfocítica crónica.

‡= Anemia hemolítica autoimmune secundaria a linfoma no Hodgkin.

¶= Solución salina amortiguada normal.

constituyente del citoesqueleto de las microvesículas eritrocitarias. El contenido total de proteínas en las suspensiones de vesículas varió de 1.83 a 2.40 µg/µL. El volumen requerido para una muestra de 300 µg de proteína varió de 125 a 164 µL con un promedio de 150 µL.

La tabla I muestra los resultados de los experimentos de aglutinación con los autoanticuerpos de los eluidos de pacientes con AHAI y con anti-D. A pesar de las diferencias en sus títulos, los diez autoanticuerpos fueron igualmente capaces de aglutinar poderosamente las microvesículas eritrocitarias. El eluido anti-D produjo una reacción de AGH 3+ con las suspensiones de microvesículas D+. En contraste, ninguno de los 20 eluidos de donadores normales con una prueba de AGH positiva, y ninguno de los otros ocho eluidos de antiseros reconociendo antígenos pertenecientes a grupos sanguíneos comunes, fueron capaces de aglutinar las vesículas eritrocitarias. No se observó tampoco aglutinación en los tubos conteniendo vesículas incubadas con BNS o suero humano normal. El examen microscópico de las vesículas sin aglutinación macroscópica también resulto negativo.

La tabla II muestra los resultados de los estudios diseñados para evaluar la fijación inmuno-específica de autoanticuerpos IgG a los antígenos en la membrana vesicular. Las vesículas sensibilizadas con los eluidos de pacientes con AHAI captaron entre 67 y 167 veces mas ¹²⁵I proteína A (cpm) que aquellas incubadas con BNS, y de 18 a 45 veces más que las incubadas con suero. Las vesículas incuba-

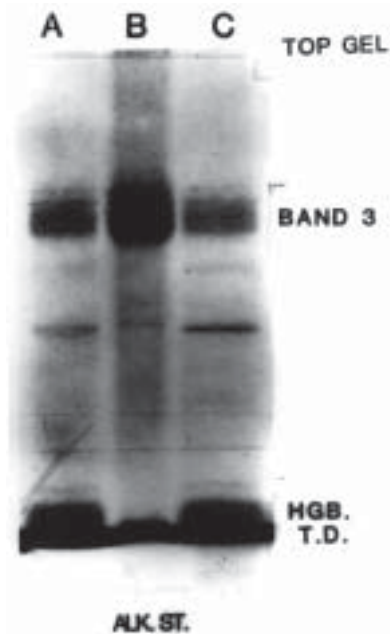


Fig. 1. Patrón de tinción con azul brillante de Coomassie de tres preparaciones de microvesículas eritrocitarias, después de que la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecyl sulfato sódico (SDS-PAGE) confirmó la ausencia de las proteínas mayores que constituyen el citoesqueleto del glóbulo rojo, específicamente de espectrina (bandas 1 y 2) y actina (banda 5), y la presencia de la Banda 3. La preparación B fue tratada con álkalí. Abreviaciones usadas: Hb: hemoglobina, T.D.: tracking dye (colorante marcador).

das con anti-D captaron 10 y 38 veces tanta ^{125}I proteína A como aquéllas incubadas con BNS y suero, respectivamente. Las vesículas incubadas con suero humano normal captaron 3.7 veces tanta ^{125}I proteína A como aquéllas incubadas con BNS.

El eluido número 1 de los pacientes con AHAI fue estudiado también con 100 μL de ^{125}I proteína A, en lugar de 20 μL , manteniendo la preparación de vesículas en 300 μg , en un esfuerzo por demostrar un incremento proporcional en la captación de ^{125}I proteína A. El resultado fue un incremento de 3.5 veces en las cpm captadas.

Discusión

La ausencia de las proteínas mayores del citoesqueleto en las microvesículas eritrocitarias fue aprovechada para probar la hipótesis de que éstas proteínas no son requeridas para la producción de la aglutinación mediada inmunológicamente. Los diez eluidos de autoanticuerpos de pacientes con AHAI reaccionaron con las microvesículas derivadas de los eritrocitos, (reacción de AGH 4+), lo cual demuestra que, dentro de las condiciones aquí descritas, la presencia de las proteínas mayores del citoesqueleto no es necesaria para que la aglutinación vesicular mediada inmunológicamente se lleve a cabo. El eluido anti-D también reaccionó con una aglutinación 3+.

La fijación inmunespecífica del eluido IgG anti-D iodinado a vesículas D+ ha sido documentada, demostrando la preservación de la inmunoreactividad del antígeno D en las microvesículas, probando que una asociación del polipéptido Rh con el citoesqueleto no es necesaria para la expresión de la actividad del antígeno D.¹⁰ Esos hallazgos fueron confirmados en este estudio, en el cual las vesículas D+ sensibilizadas con un eluido anti-D potente captaron 10 y 38 veces mas ^{125}I proteína A que las incubadas con suero humano y BNS, respectivamente (tabla II).

Los experimentos que incluyeron ^{125}I proteína A confirmaron que la aglutinación vista en los ensayos con el reactivo de AGH fueron el resultado de una poderosa interacción antígeno-anticuerpo. Los autoanticuerpos de los pacientes con AHAI en los eluidos estudiados tuvieron una alta afinidad por sus antígenos.

Tabla II. La fijación inmunespecífica de eluidos IgG de pacientes con AHAI y anti-D a microvesículas eritrocitarias fue estudiada con ^{125}I Proteína A. Se muestran las relaciones entre cpm captadas por los eluidos comparadas con las cpm captadas inespecíficamente por BNS y suero.

Preparación	cpm*	Eluido/BNS†	Reacción AGH
Eluido 1	1.16x10 ⁶	167	45
Eluido 2	8.90x10 ⁵	128	34
Eluido 3	5.74x10 ⁵	83	22
Eluido 4	4.66x10 ⁵	67	18
Eluido 5	6.10x10 ⁵	87	23
Eluido 6	5.86x10 ⁵	84	22
Anti-D	2.70x10 ⁵	38	10
BNS	6.95x10 ³	-	-
Suero	2.60x10 ⁴	-	-

*= Cuentas por minuto, ^{125}I Proteína A.

†= Solución salina amortiguada normal.

nos, como se demostró por la considerable diferencia en la captación de ^{125}I proteína A comparada con aquella de la BNS y la del suero, y por la producción clínica de AHAI severa y dependiente de transfusión.

Aunque no se pudo establecer la especificidad de los autoanticuerpos en los eluidos por las técnicas serológicas empleadas en este estudio, la considerable diferencia en las cpm captadas demostró la fijación inmuno-específica del autoanticuerpo a determinantes antigénicos sobre la superficie de las microvesículas eritrocitarias. Un reporte previo demostró que el antígeno involucrado en doce casos de AHAI en los cuales la especificidad contra antígenos del sistema Rh no pudo ser demostrada era la Banda 3.¹⁵ Los hallazgos en la presente investigación parecen conducir a la misma conclusión.

Si se asume una especificidad predominante anti Banda 3 en los autoanticuerpos de los eluidos de pacientes con AHAI, la aglutinación sin la presencia del citoesqueleto podría ser explicada por una elevada densidad antigénica en las microvesículas, correspondiente a la Banda 3, y a la movilidad lateral 50 veces mayor de esta proteína, a consecuencia de la pérdida de la restricción impuesta a través de su asociación con el citoesqueleto.²² Esta libertad de desplazamiento podría facilitar la agregación y polarización de la Banda 3, contribuyendo a una mayor aglutinabilidad. Al respecto, anticuerpos anti-Banda 3, dirigidos a su dominio citoplásmico, pueden suprimir la aglutinación de los eritrocitos inducida por la Concanavalina A, al bloquear la movilidad lateral de la Banda 3.¹¹ Las diferencias en la movilidad y en la densidad de sitios antigénicos entre el antígeno D y la Banda 3 ($1-4 \times 10^4$ sitios para D,²² 1×10^6 para la Banda 3¹⁶) podrían explicar la aglutinación con el reactivo AGH observada con el eluido anti-D (3+), comparada con la reacción 4+ producida por todos los eluidos de pacientes con AHAI. Una razón para la falta de aglutinación con los eluidos de donadores de sangre normales con una prueba de AGH positiva y con los eluidos de GR incubados con anticuerpos dirigidos contra antígenos de grupos sanguíneos diferentes de D puede ser que las vesículas eritrocitarias positivas para los antígenos correspondientes no fijen suficientes moléculas de anticuerpo para producir la aglutinación. Con los datos aportados por esta investigación puede concluirse que las proteínas mayores del citoesqueleto del eritrocito no se requieren para que se lleve a cabo la aglutinación

de vesículas eritrocitarias mediada por la IgG.

Resumen

Los factores que contribuyen a la aglutinación eritrocitaria son complejos. La participación y contribución del citoesqueleto del glóbulo rojo (GR) a este fenómeno son difíciles de separar de aquellas de la membrana plasmática. Microvesículas inmuno-reactivas, libres de citoesqueleto y enriquecidas en Banda 3 pueden ser generadas a partir de GR normales. La Banda 3 ha sido definida como un importante antígeno en la anemia hemolítica auto-inmune (AHAI). Microvesículas eritrocitarias fueron generadas y sensibilizadas con eluidos obtenidos de pacientes con AHAI. Se agregó anti-IgG humana (AGH) monoclonal y se investigó la aglutinación. La fijación específica de auto-anticuerpo se evaluó empleando ^{125}I proteína A. Se obtuvo una aglutinación de vesículas eritrocitarias 4+ con los 10 eluidos de pacientes con AHAI, las cuales fijaron 67 a 167 veces más ^{125}I proteína A que aquellas incubadas con solución salina normal amortiguada, y de 18 a 45 veces más que las vesículas incubadas con suero humano normal. Las proteínas mayores del citoesqueleto eritrocitario no se requieren para que la aglutinación de microvesículas eritrocitarias mediada inmunológicamente se lleve a cabo.

Palabras clave: Aglutinación, Citoesqueleto, Eritrocito, Microvesículas, Banda 3.

Abstract

Factors contributing to red blood cell (RBC) agglutination are complex. Participation and contribution of the RBC cytoskeleton in this phenomenon is difficult to separate from that of the plasma membrane. Immunoreactive cytoskeleton-free, band 3 enriched microvesicles can be generated from normal RBCs. Band 3 has been defined as an important antigen in autoimmune hemolytic anemia (AIHA). RBC microvesicles devoid of major cytoskeletal proteins were generated and sensitized with eluates obtained from AIHA patients, Coombs-positive blood donors and antisera to common RBC antigens. Monoclonal anti-human IgG was added and agglutination investigated. Autoantibody (AAb) immunospecific binding was evaluated employing ^{125}I Protein A. RBC vesicle agglutination with a 4+ anti-human globulin (AHG)

score was obtained with 10 AAb eluates from AIHA patients and anti-D (3+), but not with eluates from 20 Coombs-positive blood donors or antisera directed to eight other common RBC antigens. Microvesicles sensitized with AIHA eluates bound 67 to 167 times as much ^{125}I Protein A radioactivity as did those incubated with BNS, and 18 to 45 times more than vesicles incubated with normal serum.

Keywords: Agglutination, Cytoskeleton, Red blood cell, Microvesicles, Band 3.

Referencias

1. Van Oss CJ, Absolom DR. Zeta Potentials, van der Waals forces and hemagglutination. *Vox Sang* 1983;44:183-190.
2. van Oss CJ, Absolom DR. Hemagglutination and the closest distance of approach of normal, neuraminidase- and papain-treated erythrocytes. *Vox Sang* 1984;47:250-256.
3. Steane EA, Greenwalt TJ. Erythrocyte agglutination. In: Sandler SG, Schanfield MS, eds. *Immunobiology of the erythrocyte*. New York: Alan R. Liss, 1979.
4. Vengelen-Tyler V, ed. *Technical Manual*, 12th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1996.
5. Palek J. The red cell membrane. In: Beutler E, Litchman M, Collier B, Kipps T, editors. *Williams Hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1995:406-417.
6. Liu SC, Derick LH. Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: Structure-function relationships. *Semin Hematol* 1992;29:231-243.
7. Lutz HU, Liu S, Palek J. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion: I. Characterization of spectrin-free vesicles. *J Cell Biol* 1977;73:548-560.
8. Weitz M, Bjerrum OJ, Ott P, Brodbeck U. Quantitative composition and characterization of the proteins in membrane vesicles released from erythrocytes by dimyristoylphosphatidylcholine: a membrane system without cytoskeleton. *J Cell Biochem* 1982;19:179-191.
9. Leonards KS, Ohki S. Isolation and characterization of large (0.5-1.0mm) cytoskeleton-free vesicles from human and rabbit erythrocytes. *Biochem Biophys Acta* 1983;728:383-393.
10. Victoria EJ, Branks MJ, Masouredis SP. Immunoreactivity of the Rh₀(D) antigen in cytoskeleton-free vesicles. *Transfusion* 1987;27:32-35.
11. Pestonjamas KN, Metha NG. Neutral polymers elicit, and antibodies to spectrin, band 4.1 Protein And cytoplasmic domain of band 3 protein inhibit the concanavalin A-mediated agglutination of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1995;1235:10-20.
12. Pestonjamas KN, Gokhale SM, Metha NG. The role of the membrane skeleton in concanavalin A-mediated agglutination of human erythrocytes. *Biotech Applied Biochem* 1990;12:544-549.
13. Garraty G. The significance of IgG on the red cell surface. *Transfusion Medicine Reviews* 1987;1:47-57.
14. Engelfriet CP, Overbeeke, MA, von dem Borne AE. Autoimmune hemolytic anemia. *Seminars in Hematology* 1992;29:3-12.
15. Victoria EJ, Pierce SW, Branks MJ, Masouredis SP. IgG red blood cell autoantibodies in autoimmune hemolytic anemia bind to epitopes on red blood cell membrane band 3 glycoprotein. *J Lab Clin Med* 1990;115:74-88.
16. Anstee DJ. The nature and abundance of human red cell surface glycoproteins. *J Immunogenet* 1990;17:219-225.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
18. Steck TL. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J Cell Biol* 1974;62:1-19.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
20. Rekvig OP, Hannestad K. Acid elution of blood group antibodies from intact erythrocytes. *Vox sang* 1977;33:280-285.
21. Gray LS, Masouredis SP. Interaction of ^{125}I Protein A with erythrocyte-bound IgG. *J Lab Clin Med* 1982;99:399-403.
22. Masouredis SP, Sudora EJ, Mahan L, Victoria EJ. Antigen site densities and ultrastructural distribution patterns of red cell Rh antigens. *Transfusion* 1976;16:94-106.
23. Sheetz, MP. Membrane skeletal dynamics: role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *Semin Hematol* 1983;20:175-188.